

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



REC'D 22 MAY 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

FR 00/01048

COPIE OFFICIELLE

4

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 AVR. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.A) OU B))

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



N° 55 -1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir en lettres capitales

DB 540a W/170299

DATE DE REMISE DES PIÈCES 23 JUIL 1999 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 9909615 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75 INPI PARIS DATE DE DÉPÔT 23 JUIL. 1999		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE L'OREAL C. ANDRAL - D.P.I. 6, rue Bertrand Sincholle 92585 CLICHY CEDEX n° du pouvoir permanent 4412 références du correspondant OA99236/CG téléphone 01.47.56.86.81	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Titre de l'invention (200 caractères maximum) Polypeptide isolé du stratum corneum et son utilisation		3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination L'OREAL Forme juridique S.A. Nationalité (s) Adresse (s) complète (s) 14, rue Royale 75008 PARIS Pays FRANCE	
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/> Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine : _____ numéro : _____ date de dépôt : _____ nature de la demande : _____			
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° _____ date : _____ n° _____ date : _____			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire) C. ANDRAL		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI	

La loi n°79-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9909615

TITRE DE L'INVENTION:

Polypeptide isolé du stratum corneum et son utilisation

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

L'OREAL

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique)

MEHUL Bruno

2, Place de la Fontaine

92800 VILLEJUIF

FRANCE

BERNARD Dominique

48, rue Paul Barruel

75015 PARIS

FRANCE

SIMONETTI Lucie

14, rue Breguet

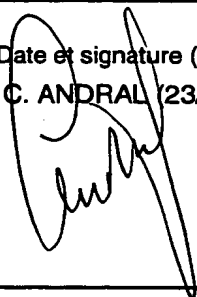
75011 PARIS

FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

C. ANDRAL (23/07/1999)



DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifié (s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p 20 - 23			X	15/02/00	25 FEV. 2000 - V D
p. 1, 2 lequency				18/02/00	25 FEV. 2000 - V D

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

L'invention a pour objet un polypeptide isolé, de la famille des protéines fixant le calcium, un mélange de polypeptides issus de la protéolyse du polypeptide isolé, des compositions les contenant, les utilisations dudit polypeptide et un procédé de traitement cosmétique destiné à traiter les peaux sèches,

5 l'hyperkératose, la parakératose, le psoriasis, l'ichtyose, les néoplasies.

L'invention a également pour objet une séquence d'acide désoxyribonucléique codant pour ledit polypeptide et les utilisations de ladite séquence d'acide désoxyribonucléique

- 10 Le rôle clef des flux de calcium dans les fonctions cellulaires a été largement décrit depuis plus de 20 ans. Ainsi le calcium est un messager intracellulaire de première importance. De nombreuses hormones et messagers extracellulaires exercent leur effet par une augmentation du taux intracellulaire de calcium. Il a été rapidement montré que la plupart des effets du calcium étaient déterminés
- 15 par une large famille relativement homogène de protéines liant le calcium. Parmi cette famille les Calmodulines sont les plus ubiquitaires.

Le rôle de la Calmoduline est de reconnaître les changements dans la concentration en ions calciques cytosoliques et de transmettre l'information aux protéines intracellulaires.

- 20 La transmission du signal est effectuée lorsque la Calmoduline lie le calcium lors d'une augmentation du taux cellulaire de celui-ci. Cela entraîne des changements de conformation de la protéine ce qui augmente de manière considérable son affinité pour la protéine cible.

- 25 En terme de configuration, la Calmoduline libre de calcium contient deux domaines globulaires connectés par un bras flexible. Chaque domaine contient deux motifs « Hélice-Boucle-Hélice » bien définis connus sous le nom de « EF-Hands » et qui sont responsables de la liaison avec le calcium. La liaison avec le calcium induit un changement conformationnel très important. Ce
- 30 changement conformationnel se traduit par une exposition de la partie hydrophobe globulaire de la protéine qui permet à la Calmoduline de reconnaître et de se lier à certaines protéines avec une haute affinité. La liaison de la Calmoduline avec sa protéine cible conduit alors à la création d'un complexe actif.

La Calmoduline est connue pour interagir avec de nombreuses protéines ou enzymes ainsi qu'avec de nombreuses drogues hydrophobes ou encore avec des peptides d'origine naturelle ou synthétique.

- 5 A cet égard on peut citer
- certaines protein-kinases impliquées dans l'homéostasie cellulaire et dans certaines fonctions cellulaires critiques telles que le métabolisme, la motilité, la transcription des gènes et la division cellulaire, la prolifération ;
 - la calcineurine qui est une phosphatase ayant un rôle dans la régulation des enzymes et protéines impliquées dans la transduction du signal calcique ;
 - la phosphodiesterase à nucléotides cycliques, la guanylylcyclase et l'adénylylcyclase régulant ainsi de manière positive et/ou négative les taux des seconds messagers AMPcyclo et GMPcyclo dans le mécanisme d'action de certaines hormones ;
 - les trois isoformes de la NO-synthase intervenant dans la production de NO et ainsi dans la relaxation vasculaire, l'action cytotoxique des macrophages, le relâchement de neurotransmetteurs, de neuropeptides et/ou d'hormones ;
 - certaines protéines du cytosquelette vitales dans le contrôle de la forme des cellules, de leur rigidité et de leur adhésion comme par exemple la myosine ;
 - la caldesmon, les spectrines, l'adducine, protéines liant l'actine ;
 - la desmocalmine, une protéine du desmosome qui interagit avec les kératines ;
 - les plasma-membrane Ca^{2+} -ATPases intervenant dans la maintenance de la concentration intracellulaire en ion ;
 - l'ornithine décarboxylase, certaines phospholipases A2 et certaines transglutaminases ont été citées comme étant calmodulin-dépendantes.
- D'autre part, certaines études suggèrent que la Calmoduline a un rôle dans les phénomènes de réparation de l'acide désoxyribonucléique et qu'elle serait potentiellement impliquée dans le vieillissement cutané.

30

On sait enfin que si la Calmoduline est une protéine bien décrite, elle est en fait le prototype d'une large famille de protéines dont tous les individus n'ont pas encore été décrits.

35

Ainsi, après de longs et laborieux travaux la demanderesse a mis en évidence, parmi les protéines de l'épiderme, isolé et purifié par des techniques biochimiques, un polypeptide exprimé dans les épithélia cornifiés. Ce

polypeptide, autrement appelé par ailleurs dans le texte "CLSP" (pour protéine de la peau similaire de la Calmoduline : Calmodulin Like Skin Protein) est exprimé dans l'épiderme. On sait que dans les épithélia cornifiés la très grande majorité des protéines exprimées est constituée par les kératines. Ainsi, ce

5 n'est qu'en élaborant une méthode d'extraction particulière éliminant les kératines, que la demanderesse a pu isoler puis purifier la CLSP.

La demanderesse en a alors déterminé la séquence primaire en acides aminés.

10 L'invention a donc pour objet un polypeptide isolé et purifié, appartenant à la famille des protéines fixant le calcium (CaBP : calcium binding protein), caractérisé par le fait qu'il répond à la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1 suivante :

Met	Ala	Gly	Glu	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Glu	10
Ala	Gln	Tyr	Lys	Lys	Ala	Phe	Ser	Ala	Val	20
Asp	Thr	Asp	Gly	Asn	Gly	Thr	Ile	Asn	Ala	30
Gln	Glu	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Thr	40
Gly	Lys	Asn	Leu	Ser	Glu	Ala	Gln	Leu	Arg	50
Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Val	Asp	Ser	Asp	Gly	60
Asp	Gly	Glu	Ile	Ser	Phe	Gln	Glu	Phe	Leu	70
Thr	Ala	Ala	Arg	Lys	Ala	Arg	Ala	Gly	Leu	80
Glu	Asp	Leu	Gln	Val	Ala	Phe	Arg	Ala	Phe	90
Asp	Gln	Asp	Gly	Asp	Gly	His	Ile	Thr	Val	100
Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Ala	Met	Ala	Gly	Leu	110
Gly	Gln	Pro	Leu	Pro	Gln	Glu	Glu	Leu	Asp	120
Ala	Met	Ile	Arg	Glu	Ala	Asp	Val	Asp	Gln	130
Asp	Gly	Arg	Val	Asn	Tyr	Glu	Glu	Phe	Ala	140
Arg	Met	Leu	Ala	Gln	Glu					146

15

Le polypeptide de l'invention peut être d'origine naturelle ou synthétique. Par synthétique on entend ici tout polypeptide obtenu chimiquement ou par production dans un organisme après introduction dans cet organisme des éléments nécessaires à cette production.

20

Le polypeptide de l'invention peut être issu de toute origine possible à savoir soit animale, en particulier de mammifères et encore plus particulièrement humaine, soit végétale, soit de micro-organismes (virus, phages, bactéries entre autres) ou encore de champignons, sans préjuger du fait qu'il soit présent

25 de manière naturelle ou non dans ledit organisme d'origine.

Préférentiellement, le polypeptide de l'invention est d'origine naturelle, purifié à partir de tissus de mammifères, particulièrement à partir de peau de mammifères.

- 5 Préférentiellement, le polypeptide de l'invention est purifié à partir de peau humaine et encore plus préférentiellement à partir d'épiderme humain.

On sait que dans un polypeptide, un ou plusieurs résidus d'acide aminé peuvent changer pour des résidus d'acide aminé ayant un index hydrophatique similaire sans pour autant changer les propriétés biologiques du polypeptide.

10 L'index hydrophatique est un index attribué aux acides aminés en fonction de leur hydrophobicité et de leur charge (Kyte et al. (1982), J. Mol. Biol. , 157 : 105).

Ainsi l'invention a également pour objet un polypeptide tel que décrit ci-dessus dans lequel un résidu d'acide aminé au moins a été changé pour un résidu d'acide aminé ayant un index hydrophatique similaire.

On sait qu'en général les polypeptides matures que l'on trouve dans les cellules proviennent de la maturation de précurseurs qui contiennent dans leur

20 séquence la séquence du polypeptide mature.

Ainsi, l'invention concerne également tout polypeptide, naturel ou synthétique, dont la séquence est en partie constituée par la séquence du polypeptide de l'invention.

25 Il est connu que les polypeptides peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme la formation de liaisons disulfures, les clivages protéolytiques spécifiques, l'addition de glucides (glycosylation), la phosphorylation en particulier au niveau des sérines et/ou des thréonines et/ou des tyrosines, et/ou l'association à des lipides.

30 Le polypeptide de l'invention peut avoir subi une ou plusieurs modifications post-traductionnelles.

Ainsi l'invention concerne aussi le polypeptide de l'invention ayant subi ou non des modifications post-traductionnelles.

On sait classer les polypeptides en fonction de leur point isoélectrique.

Le point isoélectrique théorique du polypeptide de l'invention peut être déduit de son enchaînement en acides aminés. Le polypeptide de l'invention est un polypeptide théoriquement acide.

5 Ainsi, l'invention a pour objet un polypeptide dont le point isoélectrique théorique est compris entre 1 et 6, particulièrement entre 3 et 5. Le polypeptide de l'invention a un point isoélectrique théorique de 4,075.

10 On sait que la séquence primaire en acides aminés ainsi que les diverses modifications post-traductionnelles subies par un polypeptide font que ledit polypeptide peut être caractérisé par son poids moléculaire apparent exprimé en kilodaltons.

15 On entend par poids moléculaire apparent, le poids moléculaire obtenu pour le polypeptide par comparaison de la mobilité électrophorétique de celui-ci avec celles de protéines standards de poids moléculaires connus sur gel de polyacrylamide/sodium dodécylsulfate, ou encore par comparaison du volume d'élution du polypeptide avec celui de protéines standard de poids moléculaires connus en chromatographie d'exclusion (selon les techniques décrites dans "Protein Purification", J.-C. Janson et L. Ryden, VCH Publisher, Inc., N.Y., 1989).

20 La connaissance de l'enchaînement en acides aminés du polypeptide de l'invention permet d'en déterminer le poids moléculaire théorique.

L'invention concerne donc un polypeptide ayant un poids moléculaire théorique compris entre 13 et 17 kilodaltons (kD), particulièrement entre 14 et 16 kilodaltons (kD).

25

Très particulièrement le polypeptide de l'invention a un poids moléculaire théorique de 15,9 kilodaltons (kD).

30 Il est par ailleurs connu que la séquence primaire en acides aminés d'un polypeptide détermine des sites spécifiquement reconnus par des protéases qui une fois la reconnaissance de ces sites effective vont, avec ou sans fixation audit polypeptide, induire son clivage par protéolyse.

35 Ainsi, l'invention concerne également au moins un mélange de polypeptides issus de la protéolyse du polypeptide de l'invention.

On comprend donc que dans le texte et sans indication contraire, par

polypeptide il faut entendre le polypeptide naturel ou synthétique de l'invention tel que décrit ci-dessus ou au moins l'un de ses fragments, qu'il soit obtenu par protéolyse ou de manière synthétique ou encore tout polypeptide naturel ou synthétique dont la séquence est totalement ou partiellement constituée par la
 5 séquence du polypeptide précédemment décrit.

L'analyse de la séquence primaire ne acides aminés du polypeptide de l'invention montre que celle-ci contient des sites particulier reconnus comme participant, dans les polypeptides fixant le calcium, à l'élaboration du ou des
 10 sites de fixation du calcium. La fixation du calcium par le polypeptide de l'invention est d'ailleurs confirmée par les résultats des essais présentés par ailleurs dans les exemples.

Le polypeptide de l'invention est un polypeptide qui fixe le calcium.
 15

On a vu par ailleurs dans le texte l'importance de la présence dans l'organisme des protéines de la famille de la Calmoduline. On comprend alors l'importance de pouvoir fournir à l'organisme une protéine de la famille de la Calmoduline afin de modifier les effets de celle-ci. Les applications potentielles couvrent
 20 donc toutes les voies de transduction du signal calcio-dépendante.

Par exemple en cosmétique la protéine de l'invention peut être utilisée afin de réguler les dysfonctionnements de la prolifération ou de la différenciation épidermique, normales ou pathologiques (peaux sèches, hyperkératose, parakératose, psoriasis, ichtyose, néoplasie...), dans le traitement du
 25 vieillissement, particulièrement du vieillissement cutané, dans le traitement des dommages cutanés liés à l'exposition aux rayonnements ultra-violet.

Ainsi, un autre objet de l'invention est donc de fournir des compositions comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un
 30 polypeptide tel que décrit précédemment.

Un milieu physiologiquement acceptable est selon l'invention un milieu cosmétiquement et/ou pharmaceutiquement acceptable, compatible avec la peau, les muqueuses, les ongles, les cheveux.

35 Les compositions de l'invention peuvent être des compositions cosmétiques ou pharmaceutiques.

De préférence, les compositions de l'invention sont appliquées sur la peau ou les muqueuses.

5 Le polypeptide de l'invention peut être utilisé comme agent régulant les dysfonctionnements ~~de la prolifération ou de la différenciation~~ épidermique, normales ou pathologiques particulièrement dans le traitement des peaux sèches, de l'hyperkératose, de la parakératose, du psoriasis, des ichtyoses, des néoplasies. Le polypeptide de l'invention peut ainsi être introduit dans une composition destinée au soin et/ou au maquillage de la peau, des muqueuses
10 et/ou des fibres kératiniques.

La composition de l'invention est aussi destinée à lutter contre les signes du vieillissement cutané et/ou à lutter contre les effets du rayonnement ultra-violet, particulièrement de type A ou B.

15 Un autre objet de l'invention est donc une composition destinée à traiter les dysfonctionnements ~~de la prolifération ou de la différenciation~~ épidermique, les peaux sèches, l'hyperkératose, la parakératose, le psoriasis, les ichtyoses et/ou les néoplasies.

Elle concerne aussi ~~une composition comprenant au moins un~~ polypeptide de
20 l'invention pour lutter contre les signes du vieillissement cutané et/ou lutter contre les effets du rayonnement ultra-violet, particulièrement de type A ou B.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'au moins un polypeptide de l'invention comme agent traitant les dysfonctionnements de la prolifération ou
25 de la différenciation épidermique, les peaux sèches, l'hyperkératose, la parakératose, le psoriasis, les ichtyoses et/ou les néoplasies.

Elle concerne aussi l'utilisation d'au moins un polypeptide de l'invention comme agent pour traiter les signes du vieillissement cutané et/ou lutter contre les effets du rayonnement ultra-violet, particulièrement de type A ou B.

30 Un autre objet de l'invention est encore ~~un procédé de traitement cosmétique destiné à lutter contre les dysfonctionnements de la prolifération ou de la différenciation~~ épidermique, les peaux sèches, l'hyperkératose, la parakératose, le psoriasis, les ichtyoses et/ou les néoplasies, les signes du vieillissement
35 cutané et/ou les effets du rayonnement ultra-violet, particulièrement de type A ou B, caractérisé par le fait que l'on applique sur la peau, les muqueuses et/ou

les fibres kératiniques une composition cosmétique comprenant au moins un polypeptide de l'invention.

5 La quantité de polypeptide contenue dans la composition de l'invention est, bien entendu, fonction de l'effet recherché et peut donc varier dans une large mesure.

10 Pour donner un ordre de grandeur, la composition peut contenir le polypeptide de l'invention en une quantité représentant de 0,00001% à 50% du poids total de la composition et préférentiellement en une quantité représentant de 0,001% à 10% du poids total de la composition et encore plus préférentiellement en une quantité représentant de 0,1% à 1% du poids total de la composition.

15 L'invention a également pour objet l'utilisation du polypeptide de l'invention ou de ses fragments de protéolyse et de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour préparer ou purifier, éventuellement à partir d'épiderme, toute molécule, structurale ou fonctionnelle, susceptible de se lier spécifiquement audit polypeptide isolé ou auxdits fragments de protéolyse isolés ou audit peptide synthétique.

20

Dans la mesure où le polypeptide de l'invention appartient à la famille de Calmodulines et que l'on sait que les polypeptides de cette famille sont en général des second-messagers répondant à un stimulus (le taux de calcium intracellulaire) via une fixation à leur protéine cible, il est possible d'utiliser le polypeptide de l'invention pour préparer ou purifier, éventuellement à partir d'épiderme, toute molécule, structurale ou fonctionnelle, susceptible de moduler l'interaction entre le polypeptide de l'invention et ses éventuels ligands.

25

30 Ainsi, l'invention a pour objet l'utilisation du polypeptide de l'invention ou de ses fragments de protéolyse et de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour préparer ou purifier, éventuellement à partir d'épiderme, toute molécule, structurale ou fonctionnelle, susceptible de moduler l'interaction entre le polypeptide de l'invention et ses éventuels ligands.

35

L'invention a également pour objet l'utilisation du polypeptide de l'invention ou de ses fragments de protéolyse et de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour préparer des antisérums et/ou des anticorps monoclonaux

spécifiques, visant notamment à purifier cette protéine et ses fragments. Par extension, l'invention a également pour objet toute utilisation de ladite séquence pour produire des anticorps ou fragments d'anticorps recombinants, quel que soit le système biologique utilisé pour produire ces derniers.

5

L'invention a encore pour objet un anticorps poly- ou monoclonal caractérisé par le fait qu'il reconnaît spécifiquement le polypeptide de l'invention. L'anticorps peut être un anticorps préparé par immunisation de toute espèce animale utilisable à cette fin, particulièrement le lapin. L'anticorps peut être
10 préparé par immunisation à l'aide du polypeptide de l'invention que celui-ci soit d'origine naturelle ou synthétique, purifié ou non.

On sait qu'une protéine est synthétisée dans les cellules à partir d'une matrice d'acides désoxyribonucléiques codant pour ladite protéine. On sait également
15 que le code génétique est dégénéré. Ainsi, la séquence d'acides aminés du polypeptide de l'invention peut être issue de différentes séquences d'acides désoxyribonucléiques, naturelles ou synthétiques. Par séquence d'acides désoxyribonucléiques synthétique, on entend ici toute séquence obtenue chimiquement ou par manipulation génétique.

20

Lesdites séquences d'acides désoxyribonucléiques peuvent être issues de toutes origines possibles à savoir soit animale, en particulier de mammifères et encore plus particulièrement humaine, soit végétale, soit de micro-organismes (virus, phages, bactéries entre autres) ou encore de champignons, sans
25 préjuger du fait qu'elles soient présentes de manière naturelle ou non dans ledit organisme d'origine.

La demanderesse a isolé, purifié et séquencé par des techniques de biologie moléculaire, en particulier le criblage de banques d'expression d'acides
30 désoxyribonucléiques complémentaires préparées à partir d'épiderme humain, un fragment d'acides désoxyribonucléiques codant pour le polypeptide de l'invention.

L'invention a donc également pour objet une composition cosmétique ou
35 pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, toutes séquences d'acides désoxyribonucléiques, naturelles ou synthétiques, dont tout ou partie code pour la séquence primaire d'acides aminés du

polypeptide de l'invention.

Au cours de ces travaux, la demanderesse a pu isoler et purifier une séquence d'acides désoxyribonucléiques codant pour la séquence primaire d'acides aminés du polypeptide de l'invention à partir de peau humaine.

L'invention a pour objet un fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié correspondant à la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 2 suivante :

AATTCCCGGA	TCCCTGCGGC	TGCCTGCACT	CTGGACCACG	40
AGCTCTGAGA	GCAGCAGGTT	GAGGGCCGGT	GGGCAGCAGC	80
TCGGAGGCTC	CGCGAGGTGC	AGGAGACGCA	GGCATGGCCG	120
GTGAGCTGAC	TCCTGAGGAG	GAGGCCCACT	ACAAAAAGGC	160
TTTCTCCGCG	GTTGACACGG	ATGGAAACGG	CACCATCAAT	200
GCCCAGGAGC	TGGGCGCGGC	GCTGAAGGCC	ACGGGCAAGA	240
ACCTCTCGGA	GGCCCAGCTA	AGGAAACTCA	TCTCCGAGGT	280
TGACAGCGAC	GGCGACGGCG	AAATCAGCTT	CCAGGAGTTC	320
CTGACGGCGG	CAAGGAAGGC	CAGGGCCGGC	CTGGAGGACC	360
TGCAGGTCGC	CTTCCGCGCC	TTCGACCAGG	ATGGCGACGG	400
CCACATCACC	GTGGACGAGC	TCAGGCGGGC	CATGGCGGGG	440
CTGGGGCAGC	CGCTGCCGCA	GGAGGAGCTG	GACGCCATGA	480
TCCGCGAGGC	CGACGTGGAC	CAGGACGGGC	GGGTGAACTA	520
CGAGGAGTTC	GCGAGGATGC	TCGCCCAGGA	GTGAGGCTCC	560
CCGCCTGTGT	CCCCCTGGCT	GCGCTCTGAG	CCTTCAGGGC	600
CACCGCCCGC	TGCTGCTTTT	GTGCTGGGAC	TCTCCGGGGA	640
AACCTGGTCG	GTGGATGGGA	AACTGCCTCC	CCCTGGGAGG	680
AAGGCTTTGC	GCTCCGGGGC	CTGGATGCGG	CGCCCTCGGG	720
CCGCCTGCGA	GCCCCTCTCT	GCCTTCAGAC	CTTGGGCAGA	760
AGGAGGCCTC	CTTGGGCCTG	GTCCCCCTTT	GCCCTGCAGT	800
GGAATGAGGG	CCCCTTAACC	CCGCATTGAT	CTAAATAAAG	840
GACTGCCGAG	TTCCAAAA			858

10

L'invention a aussi objet tout fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié comprenant au moins la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 2.

15

L'invention a également pour objet tout polynucléotide, acide ribonucléique ou désoxyribonucléique, sens ou antisens, correspondants au moins à la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 2.

20

Le fragment d'ADN correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 peut être introduit dans un vecteur d'expression permettant ainsi la synthèse d'une protéine dite recombinante correspondant à la CLSP.

Par protéine recombinante on entend ici tout élément peptidique correspondant

à tout ou partie de la séquence peptidique de la CLSP, obtenu de manière artificielle après introduction et expression de tout ou partie de l'ADN complémentaire de la CLSP dans un quelconque vecteur d'expression, quel que soit l'organisme qui permet cette expression.

5

Particulièrement selon l'invention, la CLSP ou une partie de la CLSP, peut être produite après introduction de tout ou partie de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 2 dans un vecteur d'expression comme par exemple le vecteur pGex-2T (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) et expression dans E.

10

Coli.

L'invention a donc également pour objet un vecteur d'expression recombinant contenant tout ou partie de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 2.

15

L'invention a encore pour objet une protéine recombinante correspondant à tout ou partie de la séquence SEQ ID NO : 1, particulièrement celle obtenue par expression d'un vecteur d'expression pGex-2T contenant tout ou partie de la séquence codante SEQ ID NO : 2.

20

L'invention a également pour objet une composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié comprenant au moins la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 2

25

L'invention a également pour objet une composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, une séquence d'acides ribonucléiques sens ou antisens correspondants à ladite séquence SEQ ID NO : 2.

30

Elle a également pour objet l'utilisation desdites séquences d'acides désoxyribonucléiques pour la production du polypeptide de l'invention ou d'un acide ribonucléique correspondant par toute technique connue comme par exemple la synthèse in vitro, à partir de milieux reconstitués ou la synthèse par des organismes ou microorganismes.

35

Quelle que soit leur nature, les compositions de l'invention peuvent être ingérées, injectées ou appliquées sur la peau (sur toute zone cutanée du corps)

ou les muqueuses (buccale, jugale, gingivale, génitale, conjonctivale, ...).

Selon le mode d'administration, les compositions selon l'invention peuvent se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées.

5

Pour une application topique sur la peau, la composition peut avoir la forme notamment de solution aqueuse ou huileuse ou de dispersion du type lotion ou sérum, d'émulsions de consistance liquide ou semi-liquide du type lait, obtenues par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse (H/E) ou
 10 inversement (E/H), ou de suspensions ou émulsions de consistance molle du type crème ou gel aqueux ou anhydres, ou encore de microcapsules ou microparticules, ou de dispersions vésiculaires de type ionique et/ou non ionique ou de mousses ou encore sous forme de compositions pour aérosol comprenant également un agent propulseur sous pression. Ces compositions
 15 sont préparées selon les méthodes usuelles.

Pour l'injection, la composition peut se présenter sous forme de lotion aqueuse, huileuse ou sous forme de sérum. Pour les yeux, elle peut se présenter sous forme de gouttes et pour l'ingestion, elle peut se présenter sous forme de
 20 capsules, de granulés, de sirops ou de comprimés.

Les quantités des différents constituants des compositions selon l'invention sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés.

25 Ces compositions constituent notamment des crèmes de nettoyage, de protection, de traitement ou de soin pour le visage, pour les mains, pour les pieds, pour les grands plis anatomiques ou pour le corps (par exemple crèmes de jour, crèmes de nuit, crèmes démaquillantes, crèmes de fond de teint, crèmes anti-solaires), des fonds de teint fluides, des laits de démaquillage, des
 30 laits corporels de protection ou de soin, des laits anti-solaires, des laits après-soleil, des lotions, gels ou mousses pour le soin de la peau, comme des lotions de nettoyage, des lotions anti-solaires, des lotions après-soleil, des lotions de bronzage artificiel, des compositions pour le bain, des compositions désodorisantes comprenant un agent bactéricide, des gels ou lotions après-
 35 rasage, des crèmes épilatoires, des compositions contre les piqûres d'insectes, des compositions anti-douleur, des compositions pour traiter certaines maladies de la peau comme l'eczéma, la rosacée, le psoriasis, les lichens, les prurits

sévères, l'ichthyose.

Les compositions selon l'invention peuvent également consister en des préparations solides constituant des savons ou des pains de nettoyage.

5

Les compositions peuvent aussi être conditionnées sous forme de composition pour aérosol comprenant également un agent propulseur sous pression.

10

La composition selon l'invention peut aussi être une composition pour les soins du cuir chevelu, et notamment un shampooing, une lotion de mise en plis, une lotion traitante, une crème ou un gel coiffant, une composition de teintures (notamment teintures d'oxydation) éventuellement sous forme de shampooings colorants, des lotions restructurantes pour les cheveux, une composition de permanente (notamment une composition pour le premier temps d'une permanente), une lotion ou un gel antichute, un shampooing antiparasitaire, les compositions antipélliculaires, etc.

15

La composition peut aussi être à usage bucco-dentaire, par exemple une pâte dentifrice. Dans ce cas, la composition peut contenir des adjuvants et additifs usuels pour les compositions à usage buccal, et notamment des agents tensioactifs, des agents épaississants, des agents humectants, des agents de polissage tels que la silice, divers ingrédients actifs comme les fluorures, en particulier le fluorure de sodium, et éventuellement des agents édulcorants comme le saccharinate de sodium.

20

Lorsque la composition est une émulsion, la proportion de la phase grasse peut aller de 5 % à 80 % en poids, et de préférence de 5 % à 50 % en poids par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les cires, les émulsifiants et les coémulsifiants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine cosmétique. L'émulsifiant et le coémulsifiant sont présents dans la composition, en une proportion allant de 0,3 % à 30 % en poids, et de préférence de 0,5 à 20 % en poids par rapport au poids total de la composition. L'émulsion peut, en outre, contenir des vésicules lipidiques.

30

35

Lorsque la composition est une solution ou un gel huileux, la phase grasse peut représenter plus de 90 % du poids total de la composition.

De façon connue, la composition cosmétique peut contenir également des adjuvants habituels dans le domaine cosmétique, tels que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les additifs hydrophiles ou lipophiles, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les charges, les filtres, les absorbeurs d'odeur et les matières colorantes. Les quantités de ces différents adjuvants sont celles classiquement utilisées dans le domaine cosmétique, et par exemple de 0,01 % à 10 % du poids total de la composition. Ces adjuvants, selon leur nature, peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse et/ou dans les sphérules lipidiques.

Comme huiles ou cires utilisables dans l'invention, on peut citer les huiles minérales (huile de vaseline), les huiles végétales (fraction liquide du beurre de karité, huile de tournesol), les huiles animales (perhydrosqualène), les huiles de synthèse (huile de Purcellin), les huiles ou cires siliconées (cyclométhicone) et les huiles fluorées (perfluoropolyéthers), les cires d'abeille, de carnauba ou paraffine. On peut ajouter à ces huiles des alcools gras et des acides gras (acide stéarique).

Comme émulsionnants utilisables dans l'invention, on peut citer par exemple le stéarate de glycérol, le polysorbate 60 et le mélange de PEG-6/PEG-32/Glycol Stéarate vendu sous la dénomination de Tefose^R 63 par la société Gattefosse.

Comme solvants utilisables dans l'invention, on peut citer les alcools inférieurs, notamment l'éthanol et l'isopropanol, le propylène glycol.

Comme gélifiants hydrophiles utilisables dans l'invention, on peut citer les polymères carboxyvinyles (carbomer), les copolymères acryliques tels que les copolymères d'acrylates/alkylacrylates, les polyacrylamides, les polysaccharides tels que l'hydroxypropylcellulose, les gommes naturelles et les argiles, et, comme gélifiants lipophiles, on peut citer les argiles modifiées comme les bentones, les sels métalliques d'acides gras comme les stéarates d'aluminium et la silice hydrophobe, éthylcellulose, polyéthylène.

La composition peut contenir d'autres actifs hydrophiles comme les protéines ou les hydrolysats de protéines, les acides aminés, les polyols, l'urée, l'allantoïne, les sucres et les dérivés de sucre, les vitamines hydrosolubles, les extraits végétaux et les hydroxyacides.

Comme actifs lipophiles, on peut utiliser le rétinol (vitamine A) et ses dérivés, le

tocophérol (vitamine E) et ses dérivés, les acides gras essentiels, les céramides, les huiles essentielles, l'acide salicylique et ses dérivés.

Selon l'invention la composition peut associer au moins un extrait d'au moins
5 une Iridacée à d'autres agents actifs destinés notamment à la prévention et/ou au traitement des affections cutanées. Parmi ces agents actifs, on peut citer à titre d'exemple :

- les agents diminuant la différenciation et/ou la prolifération et/ou la pigmentation cutanée tels que l'acide rétinoïque et ses isomères, le rétinol et
10 ses esters, la vitamine D et ses dérivés, les oestrogènes tels que l'oestradiol, l'acide kojique ou l'hydroquinone ;

- les antibactériens tels que le phosphate de clindamycine, l'érythromycine ou les antibiotiques de la classe des tétracyclines ;

- les antiparasitaires, en particulier le métronidazole, le crotamiton ou les
15 pyréthriinoïdes ;

- les antifongiques, en particulier les composés appartenant à la classe des imidazoles tels que l'éconazole, le kétoconazole ou le miconazole ou leurs sels, les composés polyènes, tels que l'amphotéricine B, les composés de la famille des allylaminés, tels que la terbinafine ou encore l'octopirox ;

- les agents antiviraux tels que l'aciclovir ;

- les agents anti-inflammatoires stéroïdiens, tels que l'hydrocortisone, le valérate de bétaméthasone ou le propionate de clobétasol, ou les agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens comme par exemple l'ibuprofène et ses sels, le diclofénac et ses sels, l'acide acétylsalicylique, l'acétaminophène ou l'acide
25 glycyrrhizique ;

- les agents anesthésiques tels que le chlorhydrate de lidocaïne et ses dérivés ;

- les agents antiprurigineux comme la thénaldine, la triméprazine ou la cyproheptadine ;

- les agents kératolytiques, tels que les acides α - et β -hydroxycarboxyliques ou β -cétocarboxyliques, leurs sels, amides ou esters et plus particulièrement les hydroxyacides, tels que l'acide glycolique, l'acide lactique, l'acide salicylique, l'acide citrique et de manière générale les acides de fruits, et l'acide n-octanoyl-5-salicylique ;

- les agents hydratants comme le glycérol et ses dérivés ;

- les agents anti-radicaux libres, tels que l' α -tocophérol ou ses esters, les superoxyde dismutases, certains chélatants de métaux ou l'acide ascorbique et

ses esters ;

- les anti-séborrhéiques tels que la progestérone ;
- les antipelliculaires comme l'octopirox ou la pyrithione de zinc ;
- les antiacnéiques comme l'acide rétinoïque ou le peroxyde de benzoyle ;
- les extraits d'origine végétale ou bactérienne.

Ainsi, selon un mode particulier, la composition selon l'invention comprend également au moins un agent choisi parmi les agents antibactériens, antiparasitaires, antifongiques, antiviraux, anti-inflammatoires, antiprurigineux, anesthésiques, kératolytiques, anti-radicaux libres, anti-séborrhéiques, antipelliculaires, antiacnéiques et/ou les agents diminuant la différenciation et/ou la prolifération et/ou la pigmentation cutanée.

Exemple 1

Matériels et méthodes :

La bibliothèque d'ADNc de kératinocytes clonée dans λ gt11 (origine des ARNm = kératinocytes de prépuces humains adultes) provient de Clontech (Palo Alto, CA, USA).

Les oligomères utilisés dans les différentes expériences sont présentés ci-après

Nom de l'oligomère	Déduit de	Position	Séquence 5' à 3'
sc5 (sens)	CLSP	168/191	GC(N)GT(N)GA(Y)AC(N)GA(Y)GG(N)AA(Y)GG(N)
sc10 (antisens)	CLSP	535/554	TCACTCCTGGGCGAGCATC
sc16 (antisens)	CLSP (+RS)	533/555	<u>TTGAATTCT</u> CACTCCTGGGCGAGCATCCTC
sc21 (antisens)	CLSP	240/257	CTGGGCCTCCGAGAGGTT
sc29 (sens)	CLSP (+RS)	113/140	<u>GATAGGATCC</u> ATGGCCGGTGAGCTGACTCCTGAGGAG
sc7 est l'oligomère SK-primer vendu par la société Stratagene,			
Not I-(dT) ₁₈ est un primer vendu par la société Amersham Pharmacia Biotech			

N = A, C, G ou T

Y = C ou T

(+RS) : site(s) de restriction ajouté(s) à la séquence, dans l'oligomère

L'oligomère dégénéré sc5 est basé sur la séquence d'acides aminés SEQ ID NO:1. Tous les autres oligomères déduits de la CLSP et leur position sont déduits de la séquence nucléotidique SEQ ID NO:2.

Not I-(dT)₁₈ est conçu pour se fixer aux longues séries de A, par exemple les polyA+. Utilisés dans les réactions de transcription réverse, Not I-(dT)₁₈ se fixe au polyA+.

10 1. Préparations à partir de stratum corneum humain

Tampons :

I : SDS 0,3% ; tris-HCl 28 mM ; tris-base 22mM

2D : 8M urée ; 2% CHAPS (3-(3-cholamidopropyl)diméthylammonio-1-propane-sulfonate) ; Dithiothréitol 20 mM ; 0,5% Imobilin pH gradient Buffer (Amersham

15 Pharmacia Biotech), pH=3 ;

Pour la purification de la CLSP, des extraits acétoniques de stratum corneum ont été préparés selon la méthode décrite par Lundstrom et Egelrød dans Acta Derm. Venerol., 1991, 71 : 471-474.

20 78 mg de poudre acétoniques ont ainsi été préparés.

2,5ml de tampon I sont ajoutés aux 78 mg de poudre acétonique et le tout est pottérisé, porté à ébullition pendant 10 minutes puis repottérisé. La solution est alors centrifugée à 10000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est recueilli et filtré à 0,22 µM. On obtient ainsi 2 ml de surnageant SI.

25 On ajoute alors au surnageant SI 10 ml d'acétone froide (10V/2V). On laisse 10 minutes au froid (glace pilée) et on centrifuge à 9400 g pendant 20 minutes à 4°C..

Le surnageant est alors éliminé et le culot séché à température ambiante pendant 20 minutes. Le culot est alors repris dans 300µl de tampon 2D. On

30 obtient ainsi l'extrait EI.

2. Gel bidimensionnel

La séparation en 2 dimensions des protéines contenues dans l'extrait EI est réalisée sur un appareil de marque Pharmacia (modèle multiphor) selon les recommandations du fournisseur.

35

La coloration des spots, la récupération de ceux-ci et le séquençage des polypeptides qu'ils contenaient ont été réalisés selon les techniques standards

décrites dans "gel electrophoresis of proteins" (IRL press), ou encore "a practical guide to protein and peptide purification for microsequencing, (Paul Matsudaira éditeur, seconde édition 1993).

5 3 Clonage et séquençage de l'ADNc CLSP :

Les ARN totaux de kératinocytes d'un équivalent d'épiderme (Episkin) ont été préparés à l'aide d'un kit de préparation RNeasy Kit et purifiés à l'aide d'un kit QIAshredder column de la marque Qiagen selon les prescriptions du fournisseur.

10 Les ADN complémentaires des ARN ainsi préparés ont été synthétisés à l'aide d'un kit First strand cDNA Synthesis kit de marque Amersham Pharmacia Biotech selon les prescriptions du fournisseur en utilisant l'oligomère NotI-d(T)18.

15 Un ADNc de 775 paires de bases ainsi obtenu a été amplifié par des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) dans un appareil à cycles thermiques de marque Perkin-Elmer (modèle Thermocycler) en utilisant une polymérase pfu de marque Stratagene et le couple d'oligomère sc5/NotI-d(T)18. Un séquençage de ce fragment a permis d'en déterminer l'enchaînement en nucléotides.

20 Afin d'obtenir la séquence complète de l'ADNc de la CLSP, des réactions de PCR ont été réalisées à l'aide des couples d'oligomères suivants sc10/sc7, sc7/sc21, sc16/sc29 dans des conditions d'expérience standards, sur une banque d'ADN complémentaires de kératinocytes clonés dans le phage λ gt11 (Stratagene).

25

Les recherches d'homologies sont effectuées via le programme WU-Blast sur le site Internet Expasy Swissprot, la détection d'éventuels sites de clivage est effectuée via le programme Omega 1.1 PC (Oxford Molecular, Oxford, U.K.).

30 Construction et expression d'une protéine CLSP recombinante :

L'ADNc de la CLSP est introduit dans le vecteur pGex-2T (Pharmacia Biotech Inc.) par coupure/ligature aux sites de restriction BamH-1/EcoRI. La construction pour laquelle la séquence codante de la CLSP est en phase avec la séquence de la glutathione S-transferase contenue dans le vecteur, est alors
35 introduite dans la bactérie E. Coli BL21. La protéine recombinante exprimée par les bactéries peut être coupée par la thrombine, la construction étant telle que la protéine de fusion obtenue porte un site de coupure par cette protéase.

L'ensemble de ces expériences a été réalisé en appliquant strictement les différents protocoles des fournisseurs.

Fixation du calcium par la CLSP :

- 5 La protéine de fusion obtenue ci-dessus est déposée sur un gel de type SDS-PAGE en présence ou en absence d'éthylène diamine tétraacétate (EDTA), agent chélateur des ions calcium, selon le protocole décrit par Burgess et col. (BBA, 623 (1980), 257-270).

10 RESULTATS:

Purification et caractérisation de la CLSP

- Parmi tous les spots analysés à partir du gel bidimensionnel, la séquence déduite d'un des spots a donné une homologie de séquence avec la Calmoduline suffisamment importante pour qu'il soit retenu mais suffisamment
15 différente pour que son analyse soit poursuivie.

A partir des éléments de séquence en acides aminés obtenus et par les techniques de biologies moléculaires ci-dessus décrites, il a été possible d'isoler et de purifier la séquence SEQ ID NO 1.

- Les homologies de séquence entre cette protéine et la Calmoduline laissent à
20 penser que cette protéine doit avoir des propriétés similaires de celles de la Calmoduline.

Quatre sites de liaison au calcium peuvent être mis en évidence dans cette séquence, à savoir les sites compris entre les acides aminés 21 et 32, 57 et 68, 91 et 102, et 127 et 138.

- 25 Les expériences de migration électrophorétique, particulièrement avec la protéine recombinante, conduites en présence ou en absence d'ions calcium confirment que la protéine fixe le calcium.

- Cette séquence correspond donc à une protéine complète, qui fixe le calcium,
30 qui n'est pas la Calmoduline et qui est présente dans le stratum corneum de l'épiderme humain.

Clonage de l'ADN de la SCLE

- Par les techniques ci-dessus décrites, un ADN de 858 paires de bases, a été
35 isolé. Ce fragment d'ADN comporte la séquence codante intégrale de la CLSP, du codon ATG en position 114 jusqu'au codon stop en position 552.

REVENDECATIONS

1. Polypeptide naturel ou synthétique purifié, caractérisé par le fait qu'il répond à la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1 :

5

Met	Ala	Gly	Glu	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Glu	10
Ala	Gln	Tyr	Lys	Lys	Ala	Phe	Ser	Ala	Val	20
Asp	Thr	Asp	Gly	Asn	Gly	Thr	Ile	Asn	Ala	30
Gln	Glu	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Thr	40
Gly	Lys	Asn	Leu	Ser	Glu	Ala	Gln	Leu	Arg	50
Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Val	Asp	Ser	Asp	Gly	60
Asp	Gly	Glu	Ile	Ser	Phe	Gln	Glu	Phe	Leu	70
Thr	Ala	Ala	Arg	Lys	Ala	Arg	Ala	Gly	Leu	80
Glu	Asp	Leu	Gln	Val	Ala	Phe	Arg	Ala	Phe	90
Asp	Gln	Asp	Gly	Asp	Gly	His	Ile	Thr	Val	100
Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Ala	Met	Ala	Gly	Leu	110
Gly	Gln	Pro	Leu	Pro	Gln	Glu	Glu	Leu	Asp	120
Ala	Met	Ile	Arg	Glu	Ala	Asp	Val	Asp	Gln	130
Asp	Gly	Arg	Val	Asn	Tyr	Glu	Glu	Phe	Ala	140
Arg	Met	Leu	Ala	Gln	Glu					146

2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est purifié à partir de mammifères.

10 3. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est purifié à partir de peau de mammifères.

4. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est purifié à partir de peau humaine.

15

5. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est purifié à partir d'épiderme humain.

20 6. Polypeptide naturel ou synthétique dont la séquence est en partie constituée par la séquence du polypeptide tel que décrit dans la revendication 1.

7. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il a un point isoélectrique théorique compris entre 1 et 6, particulièrement entre 3 et 5.

25

8. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes,

caractérisé par le fait qu'il a un poids moléculaire théorique compris entre 13 et 17 kilodaltons (kD), particulièrement entre 14 et 16 kilodaltons (kD).

- 5 9. Mélange de polypeptides issus de la protéolyse du polypeptide tel que décrit dans les revendications 1 à 8.
- 10 10. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il présente dans sa séquence primaire au moins un site de fixation du calcium.
- 11 11. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il fixe le calcium.
- 15 12. Composition caractérisée par le fait qu'elle comprend dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 11.
- 20 13. Composition destinée à réguler les dysfonctionnements de la prolifération ou de la différenciation épidermique, normales ou pathologiques, caractérisée par le fait qu'elle comprend dans un milieu cosmétiquement acceptable, au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 11.
- 25 14. Composition pour traiter les peaux sèches, l'hyperkératose, la parakératose, le psoriasis, les ichtyoses, les néoplasies, caractérisée par le fait qu'elle comprend dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 11.
- 30 15. Composition selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, caractérisée par le fait qu'elle est destinée à une application cosmétique ou pharmaceutique.
- 35 16. Utilisation d'au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 11, comme agent pour traiter les peaux sèches, l'hyperkératose, la parakératose, le psoriasis, les ichtyoses, les néoplasies.
17. Procédé de traitement cosmétique pour traiter les peaux sèches,

l'hyperkératose, la parakératose, le psoriasis, les ichtyoses, les néoplasies, caractérisé par le fait que l'on applique sur la peau du sujet à traiter une composition cosmétique telle que décrite dans les revendications 12 à 15.

- 5 18. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé codant pour le polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 11.

19. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé comprenant au moins la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 2 suivante :

10

AATTCCCGGA	TCCCTGCGGC	TGCCTGCACT	CTGGACCACG	40
AGCTCTGAGA	GCAGCAGGTT	GAGGGCCGGT	GGGCAGCAGC	80
TCGGAGGCTC	CGCGAGGTGC	AGGAGACGCA	GGCATGGCCG	120
GTGAGCTGAC	TCCTGAGGAG	GAGGCCCACT	ACAAAAAGGC	160
TTTCTCCGCG	GTTGACACGG	ATGGAAACGG	CACCATCAAT	200
GCCCAGGAGC	TGGGCGCGGC	GCTGAAGGCC	ACGGGCAAGA	240
ACCTCTCGGA	GGCCCAGCTA	AGGAAACTCA	TCTCCGAGGT	280
TGACAGCGAC	GGCGACGGCG	AAATCAGCTT	CCAGGAGTTC	320
CTGACGGCGG	CAAGGAAGGC	CAGGGCCGGC	CTGGAGGACC	360
TGCAGGTCGC	CTTCCGCGCC	TTCGACCAGG	ATGGCGACGG	400
CCACATCACC	GTGGACGAGC	TCAGGCGGGC	CATGGCGGGG	440
CTGGGGCAGC	CGCTGCCGCA	GGAGGAGCTG	GACGCCATGA	480
TCCGCGAGGC	CGACGTGGAC	CAGGACGGGC	GGGTGAACTA	520
CGAGGAGTTC	GCGAGGATGC	TCGCCCAGGA	GTGAGGCTCC	560
CCGCCTGTGT	CCCCCTGGCT	GCGCTCTGAG	CCTTCAGGGC	600
CACCGCCCGC	TGCTGCTTTT	GTGCTGGGAC	TCTCCGGGGA	640
AACCTGGTCG	GTGGATGGGA	AACTGCCTCC	CCCTGGGAGG	680
AAGGCTTTGC	GCTCCGGGGC	CTGGATGCGG	CGCCCTCGGG	720
CCGCCTGCGA	GCCCCTCTCT	GCCTTCAGAC	CTTGGGCAGA	760
AGGAGGCCTC	CTTGGGCCTG	GTCCCCCTTT	GCCCTGCAGT	800
GGAATGAGGG	CCCCTTAACC	CCGCATTGAT	CTAAATAAAG	840
GACTGCCGAG	TTCCAAAA			858

20. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique telle décrite dans la revendication 19.

- 15 21. Composition cosmétique ou pharmaceutique, caractérisée par le fait qu'elle comprend, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins une séquence nucléotidique telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 19 ou 20.

22. Utilisation d'au moins une séquence d'acide désoxyribonucléique telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 19 ou 20 pour préparer un polypeptide ou un mélange de polypeptides.

5 23. Vecteur d'expression recombinant contenant tout ou partie de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 2.

24. Protéine recombinante correspondant à tout ou partie de la séquence SEQ ID NO : 1.

10

25. Protéine recombinante obtenue par expression d'un vecteur d'expression pGex-2T contenant tout ou partie de la séquence codante SEQ ID NO : 2.

15 26. Utilisation d'au moins une séquence d'acide désoxyribonucléique telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 19 ou 20 pour préparer un acide ribonucléique.

20 27. Utilisation d'au moins un polypeptide isolé ou d'au moins l'un de ses fragments de protéolyse ou de tout peptide synthétique tel que décrit dans les revendications 1 à 11, pour préparer ou purifier toute molécule susceptible de se lier spécifiquement audit polypeptide purifié ou auxdits fragments de protéolyse purifiés ou audit peptide synthétique.

25 28. Utilisation d'au moins un polypeptide isolé ou d'au moins l'un de ses fragments de protéolyse ou de tout peptide synthétique tel que décrit dans les revendications 1 à 11, pour préparer ou purifier des antisérums ou des anticorps monoclonaux spécifiques.

30 29. Anticorps poly- ou monoclonal caractérisé par le fait qu'il reconnaît spécifiquement le polypeptide tel que décrit dans les revendications 1 à 11.

LIST OF SEQUENCES

Feuille de séquence

<110> L'OREAL

<120> Polypeptide isolé du stratum corneum et son utilisation

<130> OA99236

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 146

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Gly Glu Leu Thr Pro Glu Glu Glu Ala Gln Tyr Lys Lys Ala
1 5 10 15

Phe Ser Ala Val Asp Thr Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asn Ala Gln Glu
20 25 30

Leu Gly Ala Ala Leu Lys Ala Thr Gly Lys Asn Leu Ser Glu Ala Gln
35 40 45

Leu Arg Lys Leu Ile Ser Glu Val Asp Ser Asp Gly Asp Gly Glu Ile
50 55 60

Ser Phe Gln Glu Phe Leu Thr Ala Ala Arg Lys Ala Arg Ala Gly Leu
65 70 75 80

Glu Asp Leu Gln Val Ala Phe Arg Ala Phe Asp Gln Asp Gly Asp Gly
85 90 95

His Ile Thr Val Asp Glu Leu Arg Arg Ala Met Ala Gly Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Leu Pro Gln Glu Glu Leu Asp Ala Met Ile Arg Glu Ala Asp Val
115 120 125

Asp Gln Asp Gly Arg Val Asn Tyr Glu Glu Phe Ala Arg Met Leu Ala
130 135 140

<210> 2

<211> 858

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

aattcccgga tccctgcggc tgcctgcact ctggaccacg agctctgaga gcagcagggtt 60
gagggccggt gggcagcagc tgggaggttc cgcgaggtgc aggagacgca ggcatggccg 120
gtgagctgac tctgaggag gagggccagt acaaaaaggc tttctccgcg gttgacacgg 180
atggaaacgg caccatcaat gcccaggagc tgggcgcggc gctgaaggcc acgggcaaga 240
acctctcggg ggcccagcta aggaaactca tctccgaggt tgacagcgac ggcgacggcg 300
aaatcagctt ccaggagttc ctgacggcgg caaggaaggc cagggccggc ctggaggacc 360
tgcaggtcgc cttccgcgcc ttcgaccagg atggcgacgg ccacatcacc gtggacgagc 420
tcaggcgggc catggcgggg ctggggcagc cgctgccgca ggaggagctg gacgccatga 480
tccgcgaggg cgacgtggac caggacgggc gggagaacta cgaggagttc gcgaggatgc 540
tcgcccagga gtgaggctcc ccgcctgtgt cccctggct gcgctctgag ccttcagggc 600
caccgcccgc tgetgetttt gtgetgggac tctccgggga aaectggteg gtggatggga 660
aactgcctcc ccctgggagg aaggetttgc gctccggggc ctggatgcgg cgcctcggg 720
ccgcctgcga gcccctctct gccttcagac cttgggcaga aggaggcctc cttgggcctg 780
gtcccccttt gccctgcagt aggaatgaggg ccccttaacc ccgcattgat ctaaataaag 840
gactgccgag ttccaaaam

```

858

REVENDECATIONS

1. Polypeptide naturel ou synthétique purifié, caractérisé par le fait qu'il répond à la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1 :

5

Met	Ala	Gly	Glu	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Glu	10
Ala	Gln	Tyr	Lys	Lys	Ala	Phe	Ser	Ala	Val	20
Asp	Thr	Asp	Gly	Asn	Gly	Thr	Ile	Asn	Ala	30
Gln	Glu	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Thr	40
Gly	Lys	Asn	Leu	Ser	Glu	Ala	Gln	Leu	Arg	50
Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Val	Asp	Ser	Asp	Gly	60
Asp	Gly	Glu	Ile	Ser	Phe	Gln	Glu	Phe	Leu	70
Thr	Ala	Ala	Arg	Lys	Ala	Arg	Ala	Gly	Leu	80
Glu	Asp	Leu	Gln	Val	Ala	Phe	Arg	Ala	Phe	90
Asp	Gln	Asp	Gly	Asp	Gly	His	Ile	Thr	Val	100
Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Ala	Met	Ala	Gly	Leu	110
Gly	Gln	Pro	Leu	Pro	Gln	Glu	Glu	Leu	Asp	120
Ala	Met	Ile	Arg	Glu	Ala	Asp	Val	Asp	Gln	130
Asp	Gly	Arg	Val	Asn	Tyr	Glu	Glu	Phe	Ala	140
Arg	Met	Leu	Ala	Gln	Glu					146

2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est purifié à partir de mammifères.

10 3. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est purifié à partir de peau de mammifères.

4. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est purifié à partir de peau humaine.

15

5. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est purifié à partir d'épiderme humain.

20 6. Polypeptide naturel ou synthétique dont la séquence est en partie constituée par la séquence du polypeptide tel que décrit dans la revendication 1.

7. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il a un point isoélectrique théorique compris entre 1 et 6, particulièrement entre 3 et 5.

25

8. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il a un poids moléculaire théorique compris entre 13 et 17 kilodaltons (kD), particulièrement entre 14 et 16 kilodaltons (kD).
- 5 9. Mélange de polypeptides issus de la protéolyse du polypeptide tel que décrit dans les revendications 1 à 8.
- 10 10. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il présente dans sa séquence primaire au moins un site de fixation du calcium.
11. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il fixe le calcium.
- 15 12. Composition caractérisée par le fait qu'elle comprend dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 11.
- 20 13. Composition destinée à réguler les dysfonctionnements de la prolifération ou de la différenciation épidermique normales ou pathologiques, caractérisée par le fait qu'elle comprend dans un milieu cosmétiquement acceptable, au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 11.
- 25 14. Composition pour traiter les peaux sèches, l'hyperkératose, la parakératose, le psoriasis, les ichtyoses, les néoplasies, caractérisée par le fait qu'elle comprend dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 11.
- 30 15. Procédé de traitement cosmétique pour traiter les peaux sèches, l'hyperkératose, la parakératose, le psoriasis, les ichtyoses, les néoplasies, caractérisé par le fait que l'on applique sur la peau du sujet à traiter une composition cosmétique telle que décrite dans les revendications 12 à 14.
- 35 16. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé codant pour le polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 11.

17. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé comprenant au moins la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 2 suivante :

AATTCCCGGA	TCCCTGCGGC	TGCCTGCACT	CTGGACCACG	40
AGCTCTGAGA	GCAGCAGGTT	GAGGGCCGGT	GGGCAGCAGC	80
TCGGAGGCTC	CGCGAGGTGC	AGGAGACGCA	GGCATGGCCG	120
GTGAGCTGAC	TCCTGAGGAG	GAGGCCCACT	ACAAAAAGGC	160
TTTCTCCGCG	GTTGACACGG	ATGGAAACGG	CACCATCAAT	200
GCCCAGGAGC	TGGGCGCGGC	GCTGAAGGCC	ACGGGCAAGA	240
ACCTCTCGGA	GGCCCAGCTA	AGGAAACTCA	TCTCCGAGGT	280
TGACAGCGAC	GGCGACGGCG	AAATCAGCTT	CCAGGAGTTC	320
CTGACGGCGG	CAAGGAAGGC	CAGGGCCGGC	CTGGAGGACC	360
TGCAGGTCGC	CTTCCGCGCC	TTCGACCAGG	ATGGCGACGG	400
CCACATCACC	GTGGACGAGC	TCAGGCGGGC	CATGGCGGGG	440
CTGGGGCAGC	CGCTGCCGCA	GGAGGAGCTG	GACGCCATGA	480
TCCGCGAGGC	CGACGTGGAC	CAGGACGGGC	GGGTGAACTA	520
CGAGGAGTTC	GCGAGGATGC	TCGCCCAGGA	GTGAGGCTCC	560
CCGCCTGTGT	CCCCCTGGCT	GCGCTCTGAG	CCTTCAGGGC	600
CACCGCCCGC	TGCTGCTTTT	GTGCTGGGAC	TCTCCGGGGA	640
AACCTGGTCG	GTGGATGGGA	AACTGCCTCC	CCCTGGGAGG	680
AAGGCTTTGC	GCTCCGGGGC	CTGGATGCGG	CGCCCTCGGG	720
CCGCCTGCGA	GCCCCTCTCT	GCCTTCAGAC	CTTGGGCAGA	760
AGGAGGCCTC	CTTGGGCCTG	GTCCCCCTTT	GCCCTGCACT	800
GGAATGAGGG	CCCCTTAACC	CCGCATTGAT	CTAAATAAAG	840
GA CTGCCGAG	TTCCAAAA			858

5 18. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique telle décrite dans la revendication 17.

19. Composition cosmétique ou pharmaceutique, caractérisée par le fait qu'elle comprend, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins une
10 séquence nucléotidique telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 17 ou 18.

20. Utilisation d'au moins une séquence d'acide désoxyribonucléique telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 17 ou 18 pour préparer un
15 polypeptide ou un mélange de polypeptides.

21. Vecteur d'expression recombinant contenant tout ou partie de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 2.

20 22. Protéine recombinante correspondant à tout ou partie de la séquence SEQ

ID NO : 1.

23. Protéine recombinante obtenue par expression d'un vecteur d'expression pGex-2T contenant tout ou partie de la séquence codante SEQ ID NO : 2.

5

24. Utilisation d'au moins une séquence d'acide désoxyribonucléique telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 17 ou 18 pour préparer un acide ribonucléique.

10

25. Utilisation d'au moins un polypeptide isolé ou d'au moins l'un de ses fragments de protéolyse ou de tout peptide synthétique tel que décrit dans les revendications 1 à 11, pour préparer ou purifier toute molécule susceptible de se lier spécifiquement audit polypeptide purifié ou auxdits fragments de protéolyse purifiés ou audit peptide synthétique.

15

26. Utilisation d'au moins un polypeptide isolé ou d'au moins l'un de ses fragments de protéolyse ou de tout peptide synthétique tel que décrit dans les revendications 1 à 11, pour préparer ou purifier des antisérums ou des anticorps monoclonaux spécifiques.

20

27. Anticorps poly ou monoclonal caractérisé par le fait qu'il reconnaît spécifiquement le polypeptide tel que décrit dans les revendications 1 à 11.

1
LISTE DE SEQUENCES

FEUILLE RECTIFIÉE

<110> L'OREAL

<120> Polypeptide isolé du stratum corneum et son utilisation

<130> OA99236

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 146

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Ala	Gly	Glu	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Glu	Ala	Gln	Tyr	Lys	Lys	Ala
1				5					10					15	

Phe	Ser	Ala	Val	Asp	Thr	Asp	Gly	Asn	Gly	Thr	Ile	Asn	Ala	Gln	Glu
			20					25						30	

Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Thr	Gly	Lys	Asn	Leu	Ser	Glu	Ala	Gln
		35						40					45		

Leu	Arg	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Val	Asp	Ser	Asp	Gly	Asp	Gly	Glu	Ile
	50					55					60				

Ser	Phe	Gln	Glu	Phe	Leu	Thr	Ala	Ala	Arg	Lys	Ala	Arg	Ala	Gly	Leu
	65					70				75				80	

Glu	Asp	Leu	Gln	Val	Ala	Phe	Arg	Ala	Phe	Asp	Gln	Asp	Gly	Asp	Gly
			85						90					95	

His	Ile	Thr	Val	Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Ala	Met	Ala	Gly	Leu	Gly	Gln
			100					105					110		

Pro	Leu	Pro	Gln	Glu	Glu	Leu	Asp	Ala	Met	Ile	Arg	Glu	Ala	Asp	Val
		115					120					125			

Asp	Gln	Asp	Gly	Arg	Val	Asn	Tyr	Glu	Glu	Phe	Ala	Arg	Met	Leu	Ala
	130					135						140			

Gln Glu

145

<210> 2

<211> 858

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

aattcccgga tccctgcggc tgccctgcact ctggaccacg agctctgaga gcagcagggtt 60
gagggccggt gggcagcagc tcggaggctc cgcgagggtgc aggagacgca ggcattggccg 120
gtgagctgac tcctgaggag gagggcccagt acaaaaaggc tttctccgcg gttgacacgg 180
atggaaacgg caccatcaat gccaggagc tgggcgcggc gctgaaggcc acgggcaaga 240
acctctcgga ggcccagcta aggaaactca tctccgaggt tgacagcgac ggcgacggcg 300
aatcagctt ccaggagttc ctgacggcgg caaggaaggc caggggccggc ctggaggacc 360
tgcaggtcgc cttccgcgcc ttccaccagg atggcgacgg ccacatcacc gtggacgagc 420
tcaggcgggc catggcgggg ctggggcagc cgctgccgca ggaggagctg gacgccatga 480
tccgcgaggg cgacgtggac caggacgggc ggggtgaacta cgaggagttc gcgaggatgc 540
tcgcccagga gtgaggetcc ccgccttgtt ccccttggt gcgctctgag ccttcagggc 600
caccgcccgc tgctgctttt gtgctgggac tctccgggga aacctggtcg gtggatggga 660
aactgcctcc ccctgggagg aaggctttgc gctccggggc ctggatgcgg cgccctcggg 720
ccgcctgcga gccctctctt gccttcagac cttgggcaga agggaggcctc cttgggctg 780
gtcccccttt gccctgcagt ggaatgaggg ccccttaacc ccgcattgat ctaaataaag 840
gactgccgag ttccaaaa

```

858